

MAILED 28 NOV 2003

WFO PCT

Rec'd PCT/PTO 11 MAR 2005

BREVET D'INVENTION

10/527666

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

24 SEP. 2003

Fait à Paris, le _____

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)



Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 0 W / 0301C

REMISE DES PIÈCES			
DATE		12 JUIN 2003	
LIEU		75 INPI PARIS	
N° D'ENREGISTREMENT		0307066	
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI			
DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI		12 JUIN 2003	
Vos références pour ce dossier (facultatif) 240716 D20360 NT			

NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

Cabinet REGIMBEAU
20, rue de Chazelles
75847 PARIS CEDEX 17
FRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<input checked="" type="checkbox"/> NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date
		N°	<input type="checkbox"/>
Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale		N°	Date

 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

TRAITEMENT DES PATHOLOGIES ECHAPPANT A LA REPONSE IMMUNE PAR DES ANTICORPS
OPTIMISES

<input checked="" type="checkbox"/> DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation FRANCE Date <input type="text"/> 11 09 2002 <input type="checkbox"/> N° 0211415
		Pays ou organisation FRANCE Date <input type="text"/> 11 09 2002 <input type="checkbox"/> N° 0211416
		Pays ou organisation Date <input type="text"/> <input type="checkbox"/> N°
		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»
<input checked="" type="checkbox"/> DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique
Nom ou dénomination sociale		LABORATOIRE FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES
Prénoms		
Forme juridique		GROUPEMENT D'INTERET PUBLIC
N° SIREN		<input type="text"/> 1800361471 <input type="checkbox"/>
Code APE-NAF		<input type="text"/> <input type="checkbox"/>
Domicile ou siège	Rue	Zone d'activité de Courtabœuf - 3, avenue des Tropiques 91940 LES ULIS
	Code postal et ville	<input type="text"/> <input type="checkbox"/>
	Pays	FRANCE
Nationalité		Française
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)
Adresse électronique (facultatif)		
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»		

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 2/2

BR2

REMISE DES PIÈCES		Réervé à l'INPI
DATE	12 JUIN 2003	
LEU	75 INPI PARIS	
N° D'ENREGISTREMENT	0307066	
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		

DB 540 W / 030103

6. MANDATAIRE (s'il y a lieu)		
Nom		240716 NT
Prénom		
Cabinet ou Société		Cabinet REGIMBEAU
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	20, rue de Chazelles
	Code postal et ville	75847 PARIS CEDEX 17
	Pays	
N° de téléphone (facultatif)		01 44 29 35 00
N° de télécopie (facultatif)		01 44 29 35 99
Adresse électronique (facultatif)		info@regimbeau.fr
7. INVENTEUR (S)		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
8. RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt
		<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
9. RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition.) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
10. SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences
Le support électronique de données est joint		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		
Si vous avez utilisé l'imprimé « Suite », indiquez le nombre de pages jointes		
11. SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI
		L. MARIELLO

5 La présente invention concerne l'utilisation d'anticorps monoclonaux chimériques humanisés ou humains optimisés qui sont produits dans des lignées cellulaires sélectionnées, lesdits anticorps présentant une forte affinité pour le récepteur CD16 des cellules effectrices du système immunitaire mais également la propriété d'induire la sécrétion de cytokines et d'interleukines, en particulier l'IFNy ou l'IL2, pour le 10 traitement de pathologies pour lesquelles les cellules cibles n'expriment qu'une faible densité antigénique et dans lesquelles les cellules effectrices ne peuvent être recrutées qu'en faible quantité.

15 L'immunothérapie au moyen d'anticorps monoclonaux est en passe de devenir un des aspects les plus importants de la médecine. En revanche, les résultats obtenus lors d'essais cliniques apparaissent contrastés. En effet, il peut s'avérer que l'anticorps monoclonal ne soit pas suffisamment efficace. De nombreux essais cliniques sont arrêtés pour diverses causes telles que le manque d'efficacité et des effets secondaires 20 incompatibles avec une utilisation en thérapie clinique. Ces deux aspects sont étroitement liés sachant que des anticorps peu actifs sont administrés à forte dose pour compenser et obtenir une réponse thérapeutique. L'administration de forte dose induit non seulement des effets secondaires mais est économiquement peu viable.

25 Ces problèmes sont majeurs dans l'industrie des anticorps monoclonaux chimériques humanisés ou humains.

30 Or, ce problème est exacerbé pour un certain nombre de pathologies pour lesquelles la densité antigénique exprimée par les cellules cibles est faible et/ou le faible nombre de cellules effectrices disponibles et activées rend techniquement impossible l'utilisation d'anticorps à visée thérapeutique avec les anticorps actuellement disponibles. Par exemple, dans le Syndrome de Sezary, l'antigène spécifique, KIR3DL2, est très faiblement exprimé (seulement environ 10 000 copies). L'expression des antigènes

tumoraux peut également être régulée négativement, comme HER2Neu dans le cancer du sein. Par ailleurs, lorsque l'on cherche à inhiber l'angiogénèse via le ciblage du VEGFR2, peu de cibles sont effectivement accessibles car le récepteur est internalisé. En outre, les peptides spécifiques d'antigènes de tumeurs présentés par les molécules 5 HLA de classe 1 ou classe 2, par exemple carcinome, mélanome, cancer ovarien, cancer de la prostate sont généralement peu exprimés à la surface des cellules cibles tumorales. Enfin, une autre situation peut se trouver lors d'infections virales dans lesquelles les cellules infectées par certains virus (VHB, VIH) n'expriment que peu de molécules virales sur leur membrane.

10

Ce problème se pose aussi pour toutes les pathologies associées avec une diminution du nombre de cellules NK, ou de leur activité ou de leur nombre de CD16 (Cavalcanti M et al, Irreversible cancer cell-induced functional anergy and apoptosis in resting and activated NK cells, *Int J Oncol* 1999 Feb;14(2):361-6). On peut citer à titre d'exemple, 15 les leucémies myéloïdes chroniques (Parrado A. et al., Natural killer cytotoxicity and lymphocyte subpopulations in patients with acute leukaemia, *Leuk Res* 1994 Mar;18(3):191-7), les pathologies liées à l'environnement visant notamment les personnes exposées aux biphenyles polychlorinés (Svensson BG. et al., Parameters of immunological competence in subjects with high consumption of fish contaminated 20 with persistent organochlorine compounds, *Int Arch Occup Environ Health* 1994;65(6):351-8), les maladies infectieuses, notamment la tuberculose (Restrepo LM. et al, Natural killer cell activity in patients with pulmonary tuberculosis and in healthy controls, *Tubercle* 1990 Jun;71(2):95-102), le syndrome de la fatigue 25 chronique (CFS) (Whiteside TL, Friberg D, Natural killer cells and natural killer cell activity in chronic fatigue syndrome, *Am J Med* 1998 Sep 28;105(3A):27S-34S), et toutes les infections parasitaires comme par exemple les schistosomules (Feldmeier H, et al, Relationship between intensity of infection and immunomodulation in human schistosomiasis. II. NK cell activity and in vitro lymphocyte proliferation, *Clin Exp Immunol* 1985 May; 60(2):234-40).

30

Ainsi, l'objectif est d'obtenir de nouveaux anticorps présentant une meilleure efficacité comparée aux anticorps actuels, ce qui permettrait d'envisager leur utilisation en thérapie pour les pathologies présentant peu de cibles ou une faible densité antigénique ainsi qu'un nombre limité de cellules effectrices capables d'être activées.

5

Nous avions montré dans notre demande WO 01/77181 (LFB) l'importance de sélectionner des lignées cellulaires permettant de produire des anticorps présentant une forte activité ADCC du type Fc γ RIII (CD16). Nous avions trouvé que la modification de la glycosylation du fragment constant des anticorps produits dans des lignées de myélomes de rat telle que YB2/0 conduisait à améliorer l'activité ADCC. Les structures glycanniques desdits anticorps sont de type biantennées, avec des chaînes courtes, une faible sialylation, des mannooses et GlcNAc du point d'attache terminaux non intercalaires, et une faible fucosylation.

15

Or, dans le cadre de la présente invention, nous avons découvert que l'avantage de présenter une forte affinité pour le CD16 peut encore être renforcé par des conditions supplémentaires visant à produire des anticorps qui induisent également la production de cytokines, notamment la production d' IFN γ ou l'IL2 .

20

Les deux caractéristiques précitées se complémentent. En effet, la production d' IFN γ ou l'IL2 induite par les anticorps sélectionnés par le procédé de l'invention peut renforcer l'activité ADCC. Le mécanisme d'action d'une telle activation tient probablement à une régulation positive autocrine des cellules effectrices. On peut postuler que les anticorps se lient au CD16 provoquant une activité cytotoxique mais également induisent la production de l' IFN γ ou l'IL2 qui au final conduit à augmenter encore davantage l'activité cytotoxique.

30 Nous montrons ici que les anticorps optimisés de l'invention conservent une bonne efficacité même lorsque l'on diminue la densité antigénique ou le nombre de cellules effectrices. Ainsi, à des doses compatibles avec une utilisation en thérapie clinique, il

est désormais possible de traiter des pathologies pour lesquelles un traitement par anticorps n'était pas envisageable à ce jour.

5 Description

Ainsi, l'invention concerne l'utilisation d'un anticorps monoclonal chimérique humanisé ou humain optimisé caractérisé en ce que :

10 a) il est produit dans une lignée cellulaire sélectionnée pour ses propriétés de glycosylation du fragment Fc d'un anticorps, ou
b) la structure glycannique du Fcgamma a été modifiée ex vivo, et/ou
c) sa séquence primaire a été modifiée de façon à augmenter sa réactivité vis à vis des récepteurs Fc ;
ledit anticorps présentant i) un taux ADCC de type Fc γ RIII (CD16) supérieur à 50 %, 15 de préférence supérieur à 100 % pour un ratio E/T (cellules effectrices/cellules cibles) inférieur à 5/1, de préférence inférieur à 2/1, comparé au même anticorps produit dans une lignée CHO ; et ii) un taux de production d'au moins une cytokine par une cellule effectrice du système immunitaire exprimant le récepteur CD16 supérieur à 50 %, 100 % ou de préférence supérieur à 200 % comparé au même anticorps produit dans une 20 lignée CHO;

pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies pour lesquelles le nombre de sites antigéniques ou la densité antigénique est faible, les antigènes sont peu accessibles aux anticorps, ou encore pour lesquelles le nombre de cellules effectrices activées ou recrutées est faible.

25

Avantageusement, le nombre de sites antigéniques est inférieur à 250 000, de préférence inférieur à 100 000 ou 50 000 par cellule cible.

30 Lesdites cytokines libérées par les anticorps optimisés sont choisies parmi des interleukines, des interférons et des facteurs de nécrose tissulaire (TNF).

Ainsi, l'anticorps est sélectionné pour sa capacité d'induire la sécrétion d'au moins une cytokine choisie parmi IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10,... TNF α , TGF β , IP10 et IFN γ par les cellules effectrices du système immunitaire 5 exprimant le récepteur CD16.

De préférence, l'anticorps sélectionné présente la capacité d'induire la sécrétion d' IFN γ ou d'IL2 par les cellules effectrices du système immunitaire exprimant le récepteur CD16 ou de l'IL2 par la cellule Jurkat CD16 pour un faible nombre de sites 10 antigéniques présents à la surface des cellules cibles ou pour un faible nombre d'antigènes accessibles aux anticorps. Le taux IFN γ ou d'IL2 sécrétée reflète la qualité de l'anticorps fixé par le récepteur CD16 quant à son intégrité (fonction FC) et à son efficacité (site antigénique) de liaison à l'antigène. En outre, la sécrétion d' IFN γ ou 15 d'IL2 par les cellules du système immunitaire peut activer l'activité cytotoxique des cellules effectrices. Ainsi, les anticorps de l'invention sont également utiles pour le traitement de pathologies pour lesquelles le nombre de cellules effectrices activées ou recrutées est faible.

Les cellules effectrices peuvent exprimer un CD16 endogène ou être transformées. On 20 entend par cellule transformée, une cellule modifiée génétiquement de sorte à exprimer un récepteur, en particulier le récepteur CD16.

Dans un mode de réalisation particulier, l'anticorps de l'invention est capable d'induire la sécrétion d'au moins une cytokine par une cellule leucocytaire, en particulier de la 25 famille des NK (natural killer) ou par des cellules du groupe monocytes-macrophages. De préférence, on utilise pour la sélection des anticorps une lignée Jurkat transfectée avec un vecteur d'expression codant pour le récepteur CD16 comme cellule effectrice. Cette lignée est particulièrement avantageuse car elle est immortalisée et se développe indéfiniment dans des milieux cultures. Le taux d'interleukine IL2 sécrétée reflète la

qualité de l'anticorps fixé par le récepteur CD16 quant à son intégrité (fonction FC) et à son efficacité (site antigénique) de liaison à l'antigène.

5 Dans un autre mode de réalisation, l'anticorps optimisé peut être préparé après avoir été purifié et/ou modifié ex vivo par modification de la structure glycannique du fragment Fc. A cet effet, on peut utiliser tout moyen chimique, chromatographique ou enzymatique approprié pour modifié la structure glycannique des anticorps.

10 Dans un autre mode de réalisation, l'anticorps peut être produit par des cellules de lignées de myélomes de rat, en particulier YB2/0 et ses dérivées. D'autres lignées peuvent être sélectionnées pour leurs propriétés de produire les anticorps définis ci-dessus. On pourra tester par exemple les cellules lymphoblastoïdes humaines, les cellules d'insectes et les cellules de myélomes murines. La sélection peut également être appliquée à l'évaluation des anticorps produits par des plantes transgéniques ou de 15 mammifères transgéniques. A cet effet, la production dans CHO sert de référence (CHO étant employée pour la production d'anticorps médicament) pour comparer et sélectionner les systèmes de production conduisant aux anticorps selon l'invention.

20 La structure glycannique générale de l'anticorps correspond à un type biantennés, avec des chaînes courtes, une faible sialylation, des mannose et GlcNAc du point d'attache terminaux non intercalaires, et une faible fucosylation. Dans ces anticorps, le taux de GlcNac intermédiaire est non nul.

25 Ainsi, l'invention vise l'utilisation d'un anticorps décrit ci-dessus pour la préparation d'un médicament destiné au traitement d'une pathologie échappant à la réponse immune notamment choisie parmi la maladie hémolytique du nouveau né, le Syndrome de Sezary, les leucémies myéloïdes chroniques, les cancers dont les cibles antigéniques sont faiblement exprimées, notamment le cancer du sein, les pathologies liées à l'environnement visant notamment les personnes exposées aux biphenyles 30 polychlorinés, les maladies infectieuses, notamment la tuberculose, le syndrome de la

fatigue chronique (CFS), les infections parasitaires comme par exemple les schistosomules.

Exemple 1 : anti-Rhésus/ADCC en fonction du nombre de sites antigéniques.

5

La même séquence codant pour une IgG1 spécifique de l'antigène Rhésus D est transfectée dans CHO et YB2/0. L'activité cytotoxique des anticorps est comparée vis à vis des hématies rhésus positif exprimant à leur surface différentes quantités d'antigène Rhésus, c'est à dire : hématies O+ normales (10-20 000 sites), hématies D faibles sous- exprimant l'antigène Rhésus (<5000 sites) et hématies sur-exprimant l'antigène rhésus (>60000 sites).

10

15

La différence d'activité ADCC entre l'anticorps exprimé dans CHO et l'anticorps exprimé dans YB2/0 est moindre sur les hématies sur-exprimant l'antigène Rhésus surtout aux fortes quantités d'anticorps et augmente au fur et à mesure que le nombre de site antigénique décroît.

20

Les résultats sont présentés à la Figure 1 :

L'activité ADCC des anticorps exprimés dans CHO (triangle) ou YB2/0 (carré) sur des hématies normales (N, vide) ou sur-exprimant l'antigène Rhésus (GR6, plein) sont comparées.

Exemple 2 : anti-HLA DR/ADCC en fonction de la quantité d'effecteurs

25

La même séquence codant pour une IgG1 spécifique de l'antigène HLA-DR est transfectée dans CHO et YB2/0. L'activité cytotoxique des anticorps est comparée vis à vis de la cellule Raji en présence de différents ratios effecteurs/cible (voir Figure 2).

30

La différence d'activité cytotoxique entre l'anticorps optimisé exprimé par YB2/0 et CHO s'accroît au fur et à mesure que le ratio E/T diminue. Ainsi, pour les ratios suivants, 20/1 ; 10/1 ; 5/1 ; et 2/1, le pourcentage relatif de lyse induit par l'anticorps

exprimé dans CHO (100% étant la valeur de l'anticorps exprimé dans YB2/0 pour chaque ratio) est de 61%, 52%, 48% et 36% respectivement.

L'anticorps exprimé dans YB2/0 s'avère plus cytotoxique que CHO dans des conditions de faibles quantités d'effecteurs.

5

Exemple 3 : anti-HLA DR/ADCC en fonction de la quantité d'antigènes accessibles

La même séquence codant pour une IgG1 spécifique de l'antigène HLA-DR est 10 transfectée dans CHO et YB2/0. L'activité cytotoxique des anticorps est comparée vis à vis de la cellule Raji en présence de différents ratios effecteurs/cible (ratio E/T).

L'activité cytotoxique des anticorps est comparée vis à vis de cellules Raji dont les 15 sites antigéniques ont été préalablement bloqués avec des quantités croissantes d'un anticorps murin inactif anti-HLA-DR, de façon à avoir un nombre décroissant d'antigène HLA-DR disponible vis à vis des anticorps à évaluer (voir Figure 3).

Moins il y a de sites antigéniques disponibles, plus la différence entre l'anticorps optimisé (YB2/0) et l'anticorps produit dans CHO augmente. Cela indique qu'une des 20 applications de l'anticorps optimisé peut concerner des cellules exprimant à leur surface un antigène peu exprimé reconnu par l'anticorps thérapeutique. Ceci procure un net avantage vis à vis d'un anticorps exprimé dans une cellule de type CHO.

Exemple 4 : anti-HLA DR/Jurkat, production d'IL2 en fonction de la quantité 25 d'antigènes accessibles

La même séquence codant pour une IgG1 spécifique de l'antigène HLA-DR est transfectée dans CHO et YB2/0. L'activation de la cellule effectrice (sécrétion d'IL2 par Jurkat CD16) induite par les anticorps est comparée vis à vis de cellules Raji dont 30 les sites antigéniques ont été préalablement bloqué avec des quantités croissantes d'un

anticorps murin anti-CD20, de façon à avoir un nombre décroissant d'antigène HLA-DR disponible vis à vis des anticorps à évaluer (voir Figure 4).

5 Ces résultats montrent également que moins il y a de sites antigéniques disponibles, plus la différence entre l'anticorps optimisé (YB2/0) et l'anticorps produit dans CHO augmente.

Exemple 5 : anti-CD20/ADCC en fonction de la quantité d'antigènes.

10 Les résultats obtenus avec l'anti-CD20 en ADCC confirment ceux obtenus avec les anti-HLADR, c'est à dire que moins il y a de sites antigéniques disponibles, plus la différence entre l'anticorps optimisé (YB2/0) et l'anticorps produit dans CHO augmente.

15 **Exemple 6 : anti-CD20/Jurkat, production d'IL2 en fonction de la quantité d'antigènes accessibles.**

20 La même séquence codant pour une IgG1 spécifique de l'antigène CD20 est transfectée dans CHO et YB2/0. L'activation de la cellule effectrice (sécrétion d'IL2 par Jurkat CD16) induite par les anticorps est comparée vis à vis de cellules Raji dont les sites antigéniques ont été préalablement bloqué avec des quantités croissantes d'un anticorps murin inactif anti-CD20, de façon à avoir un nombre décroissant d'antigène CD20 disponible vis à vis des anticorps à évaluer (voir Figure 5).

25 Moins il y a de sites antigéniques disponibles, plus la différence entre l'anticorps optimisé (YB2/0) et l'anticorps produit dans CHO augmente. Cela indique qu'une cellule exprimant une faible densité antigénique peut néanmoins activer une cellule effectrice via un anticorps optimisé. Cette fonction est beaucoup plus restreinte voire nulle avec un anticorps exprimé dans CHO.

Les applications thérapeutiques de l'anticorps optimisé peuvent ainsi concerner des cellules exprimant à leur surface un antigène peu exprimé.

- 5 En conclusion, les anticorps optimisés s'avèrent particulièrement utiles pour des applications thérapeutiques liées à des cellules cibles qui expriment à leur surface peu d'antigène, quel que soit l'antigène utilisé.

REVENDICATIONS

5 1. Utilisation d'un anticorps monoclonal chimérique humanisé ou humain optimisé caractérisé en ce que :

10 a) il est produit dans une lignée cellulaire sélectionnée pour ses propriétés de glycosylation du fragment Fc d'un anticorps, ou

15 b) la structure glycannique du Fcgamma a été modifiée ex vivo, et/ou

20 c) sa séquence primaire a été modifiée de façon à augmenter sa réactivité vis à vis des récepteurs Fc ;

25 ledit anticorps présentant i) un taux ADCC de type FcγRIII (CD16) supérieur à 50 %, de préférence supérieur à 100 % pour un ratio E/T (cellules effectrices/cellules cibles) inférieur à 5/1, de préférence inférieur à 2/1, comparé au même anticorps produit dans une lignée CHO ; et ii) un taux de production d'au moins une cytokine par une cellule effectrice de type Jurkat CD16 ou issue du système immunitaire exprimant le récepteur CD16 supérieur à 50 %, 100 % ou de préférence supérieur à 200 % comparé au même anticorps produit dans une lignée CHO ;

30 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies pour lesquelles le nombre de sites antigéniques, la densité antigénique est faible ou les antigènes sont peu accessibles aux anticorps, ou encore pour lesquelles le nombre de cellules effectrices activées ou recrutées est faible.

25 2. Utilisation selon la revendication 1 caractérisée en ce que le nombre de sites antigéniques est inférieur à 250 000, de préférence inférieur à 100 000 ou 50 000 par cellule cible.

30 3. Utilisation selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que lesdites cytokines libérées par les anticorps optimisés sont choisies parmi des interleukines, des interférons et des facteurs de nécrose tissulaire (TNF).

4. Utilisation selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que l'anticorps optimisé induit la sécrétion d'au moins une cytokine choisie parmi IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, ... TNF α , TGF β , IP10 et IFN γ par les cellules effectrices du système immunitaire exprimant le récepteur CD16.
5
5. Utilisation l'une des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que l'anticorps induit la sécrétion d'IL-2 par la cellule Jurkat CD16 ou d' IFN γ et d'IL2 par les cellules effectrices du système immunitaire exprimant le récepteur CD16 pour un faible nombre de sites antigéniques présents à la surface des cellules cibles ou pour un faible nombre d'antigènes accessibles aux anticorps ou pour un faible nombre de cellules effectrices.
10
6. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que la cellule effectrice est une cellule leucocytaire, en particulier de la famille des NK (natural killer) ou une cellule du groupe monocytes-macrophages.
15
7. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que la cellule effectrice est une cellule Jurkat transfectée avec un vecteur d'expression codant pour le récepteur CD16.
20
8. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que l'anticorps optimisé est préparé après avoir été purifié et/ou modifié ex vivo par modification de la structure glycannique du fragment Fc.
25
9. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que l'anticorps optimisé est produit par des cellules de lignées de myélomes de rat, en particulier YB2/0 et ses dérivées.

10. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que l'anticorps optimisé présente une structure glycannique générale de type biantennés, avec des chaînes courtes, une faible sialylation, des mannoses et GlcNAc du point d'attache terminaux non intercalaires, et une faible fucosylation.

5

11. Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'anticorps optimisé présente un taux de GlcNac intermédiaire non nul.

10 12. Utilisation d'un anticorps selon l'une des revendications 1 à 11 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement d'une pathologie choisie parmi la maladie hémolytique du nouveau-né, le Syndrome de Sezary, les leucémies myéloïdes chroniques, les cancers dont les cibles antigéniques sont faiblement exprimées, notamment le cancer du sein, les pathologies liées à l'environnement visant notamment les personnes exposées aux biphenyles polychlorinés, les maladies infectieuses, 15 notamment la tuberculose, le syndrome de la fatigue chronique (CFS), les infections parasitaires comme par exemple schistosomules.

20

ADCC sur hématies : comparaison hématies normales(N) versus hématies sur-exprimant l'antigène Rhésus (GR6).
(Teg 500 μ g/puits, ADC 375 03 017)

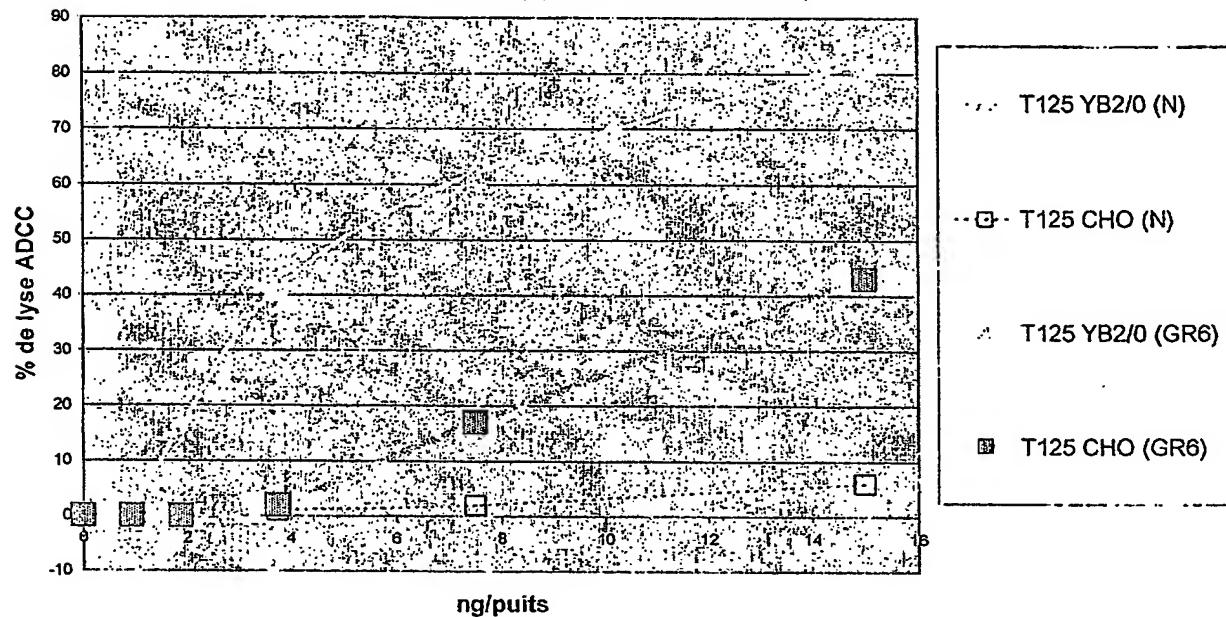


FIGURE 1

ADCC CHO versus YB2/0 anti-HLA DR purifiés à 10ng/p (170502, 150502)

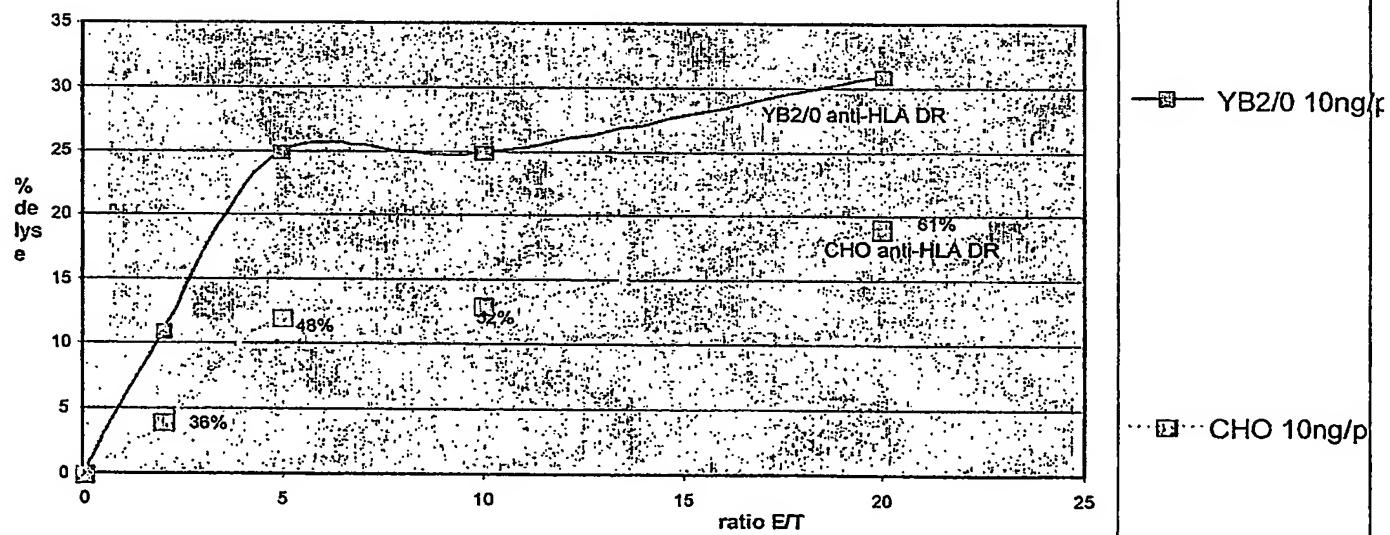


FIGURE 2

BEST AVAILABLE COPY

TOX 324 03/067 ; % de LYSE ADCC - ADCC Lim 1; GAMME ETALON à TO

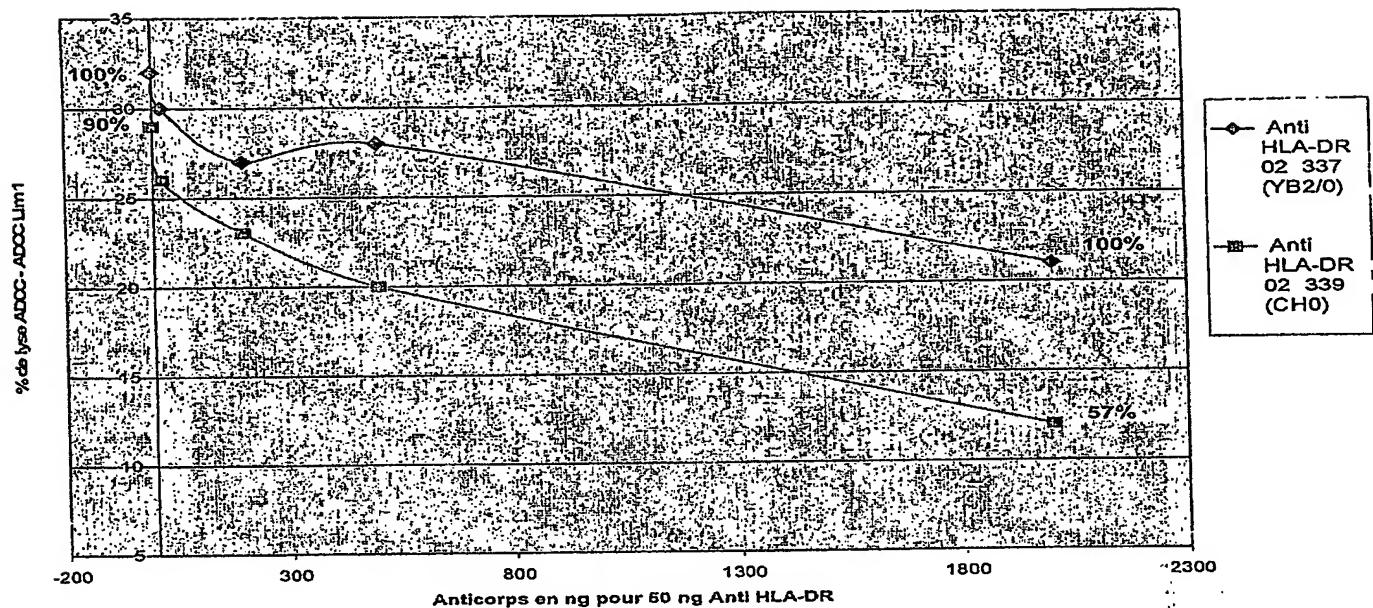


FIGURE 3

TOX 324 03/069

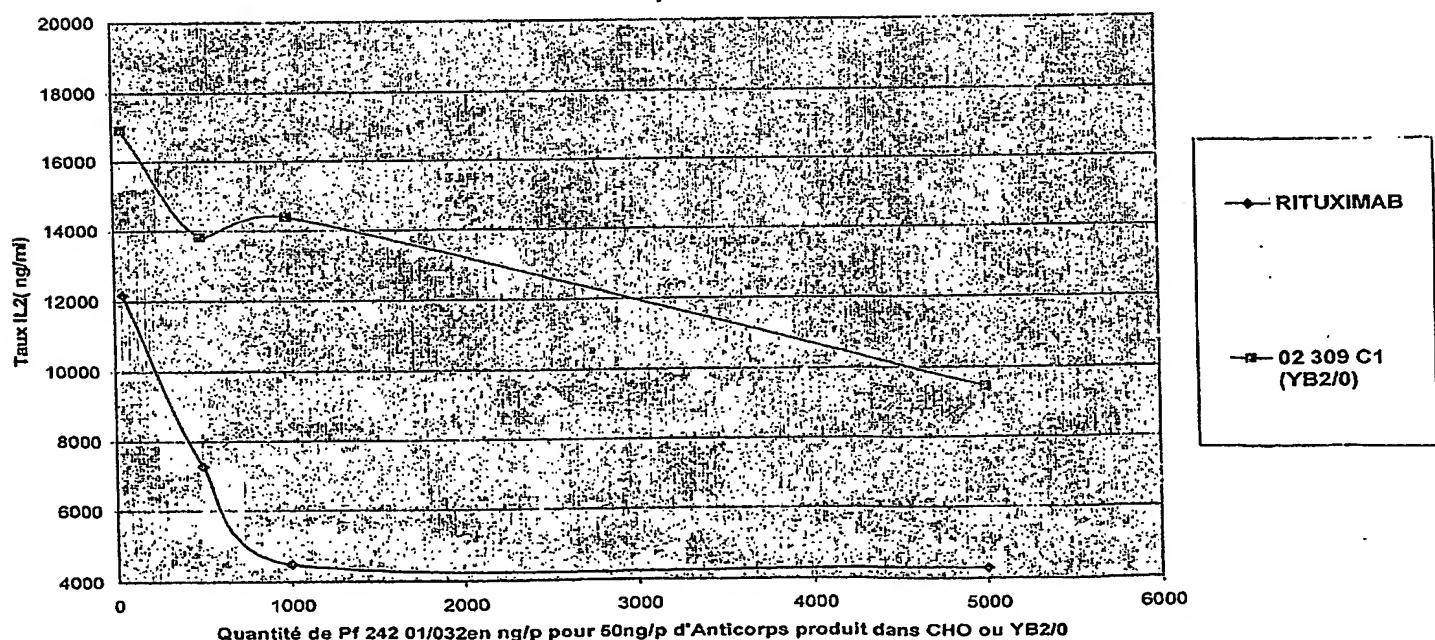


FIGURE 4

BEST AVAILABLE COPY

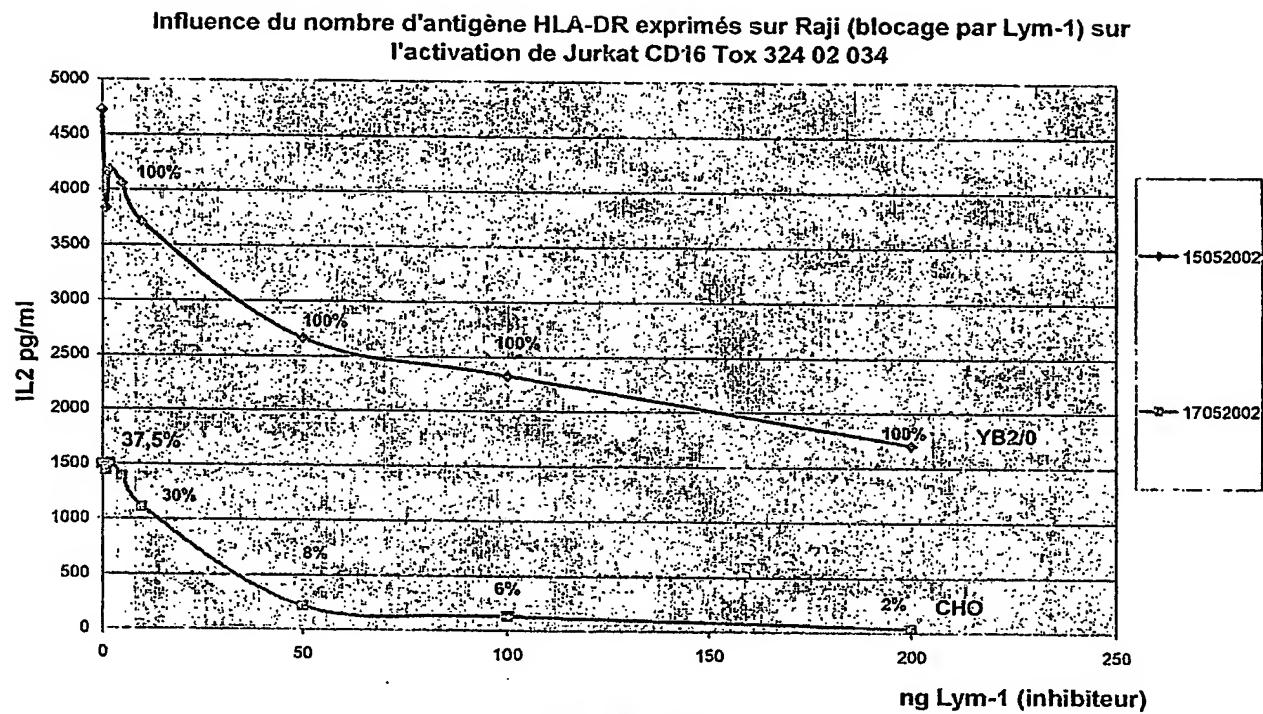


FIGURE 5

BEST AVAILABLE COPY